

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE
BANANEIRA**

TAISE PAIXÃO DOS SANTOS

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2018**

CRIOPRESERVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE BANANEIRA

Taise Paixão dos Santos

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia , 2015

Dissertação submetida ao Colegiado do Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e da Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Dr^a. Janay Almeida dos
Santos-Serejo

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Taise Paixão dos

Criopreservação e germinação de sementes de bananeira / Taise Paixão dos Santos. – Cruz das Almas, BA, 2018.

50 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Janay Almeida dos Santos-Serejo.

Dissertação (Recursos Genéticos Vegetais)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2018.

1. Banana. 2. Criopreservação. 3. nitrogênio líquido I. Santos-Serejo, Janay Almeida dos. II. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia III. Título.

CDD: 634.772

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

CRIOPRESERVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTE DE BANANA

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação

Taise Paixão Dos Santos

Aprovada em 30 de julho de 2018

Dra. Janay Almeida dos Santos-Serejo
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Dra. Cristina Ferreira Nepomuceno
PNPD Capes/UFRB
(Examinador Externo)

Profa. Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
Examinador Interno

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Lia e Germinio, pelo amor e dedicação.

As minha irmãs Itainá e Taiane pelo incentivo.

Minha tia Tota (*In memorian*), que tanto me faz falta, e sempre acreditou em mim.

E a todos que acreditaram e torceram por mim.

Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me presenteado com pessoas maravilhosas que me incentivaram para concluir mais uma etapa da minha vida.

Agradeço a minha orientadora Janay pela oportunidade, paciência compreensão e carinho. Obrigada pelos puxões de orelha, que na verdade foram incentivos para que eu não desistisse. Admiro muito sua forma leve e sábia de lhe dar com os problemas.

Sou grata também à pesquisadora Fernanda Vidigal pela colaboração e sugestões neste trabalho.

Aos professores e colegas do Mestrado de Recursos Genéticos Vegetais da UFRB.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e à Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo apoio institucional me proporcionando a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

A todos os amigos que muito me incentivaram nessa jornada.

Manassés, essa vitória é nossa! Oazuc, obrigada por todo incentivo e por não ter deixado meu pessimismo me fazer desistir. Você acompanhou de perto todos os meus passos e sabe como ninguém o quanto foi difícil chegar até aqui. Cheguei, chegamos! Amigo, obrigada por cada momento que passamos juntos, muitos risos, lágrimas, carinho, paciência e conselhos. Amo muito você.

Simone Fiúza, minha mãe de Cruz. Obrigada amiga pelos conselhos e incentivos e compreensão. É muito saber que posso contar com você sempre. Te amo, amiga.

Sou grata a Renata e Cida por acreditarem em mim até mesmo quando eu duvidava da minha própria capacidade. Amo vocês!!

Taíse Rodrigues, obrigada pelos risos, conselhos e ajuda. Minha cúmplice de resgate de embrião (rsrsrs).

Wil, obrigada pelos momentos juntos. Você me ajudou muito nos momentos de desespero e tristeza. Obrigada pela sua lealdade e compreensão. Amo muito você!!
Tatá, obrigada pelos momentos que alegria que me proporcionou.

Dani, obrigada pelos seus conselhos no ônibus, muito valiosos.

Pedro e Adinael agradeço pelos incentivos e motivação todas as vezes que montamos os experimentos. Sempre dispostos, com sorriso no rosto me falavam: Vamos conseguir Tai, você vai ver! Amo muito vocês.

Luzia, obrigada pelas orações e vibrações!

Mariana, pelas aulas de inglês e por sempre me motivar sempre. Obrigada!

Fabi, obrigada por tudo. Você é uma pessoa maravilhosa.

Cristina, você é incrível. Muita sabedoria, bondade e profissionalismo. Obrigada!.

À Ronilze pela paciência e por me ensinar as praticas de laboratório. Agradeço também a Hilo e Taliane por sempre tirarem minhas dúvidas e me ajudarem sempre que precisei.

A todos laboratório de Cultura de Tecidos (Wagner, Fernanda, Rafaelle, Simone, Jamile, Daniela Max, Cíntia) que estavam sempre na torcida.

Helder, obrigada por tentar me ajudar compartilhando seu conhecimento. Admiro muito a sua sabedoria. Obrigada por tudo!

Antônio Leandro, obrigada pela atenção e paciência. Você é um grande amigo!

Sou grata a todos do laboratório de práticas culturais (Sinésio, Rafael, Bizunga, Teles, Fabrício e Catra), pela disposição em me ajudar e pelo carinho.

Ao grupo da banana o qual fiz parte e que aprendi bastante.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

A persistência é o caminho do êxito.

Charles Chaplin

CRIOPRESERVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE BANANEIRA

RESUMO: As sementes de bananeira perdem sua viabilidade em pouco tempo quando conservadas a temperatura ambiente. Embora a manutenção sob-refrigeração possa prolongar a viabilidade das sementes por até um ano, a conservação por longos períodos seria possível mediante criopreservação. Como ainda não existem protocolos definidos para a criopreservação de sementes de bananeira, o objetivo deste estudo foi investigar a germinação *in vitro* e em casa de vegetação de sementes de bananeira criopreservadas por sete dias em contato direto e indireto com o nitrogênio líquido, visando à adequação de condições para criopreservar as sementes. Foram utilizadas sementes de onze genótipos de banana, realizando-se dois experimentos: I - criopreservação, resgate e cultivo *in vitro* de embrião de sementes de banana não dessecadas e dessecadas por 5 e 24 horas, acondicionadas em criotubos contendo nitrogênio líquido (NL) e em criotubos sem NL; II - criopreservação de sementes de bananeira acondicionadas em criotubos contendo NL e sem NL por sete dias, seguida da germinação em casa de vegetação. No resgate de embrião e cultivo *in vitro*, foi observado que as sementes de banana toleram a criopreservação mesmo sem dessecação, sendo que o tratamento com 5 horas de dessecação sem NL dentro do criotubo, foi o que obteve maior porcentagem de germinação. As plantas regeneradas foram morfológicamente normais. Em casa de vegetação, no entanto, o tratamento de criopreservação com o contato direto das sementes com NL proporcionou a maior porcentagem de germinação. Pode-se concluir que as sementes de banana podem ser criopreservadas com teor de água variando 7,86 a 11,13. Além disso, o cultivo *in vitro* de embriões proporciona maior porcentagem de germinação do que a sementeira em casa de vegetação.

Palavras-chave: Dessecação; *Musa* spp.; nitrogênio líquido; resgate de embrião

CRYOPRESERVATION AND GERMINATION OF BANANA SEEDS

ABSTRACT: Banana seeds lose their viability in a short time when stored at room temperature. Although under refrigeration maintenance can prolong the viability of the seeds for up to one year, the conservation for long periods would be possible through cryopreservation. Since there are still no defined protocols for cryopreservation of banana seeds, the objective of this study was to investigate the in vitro and in vitro germination of banana seeds cryopreserved for seven days in direct and indirect contact with the liquid nitrogen, aiming at the adequacy conditions for cryopreserving seeds. Seeds of eleven banana genotypes were used. Two experiments were carried out: I - cryopreservation, in vitro rescue and in vitro embryo cultivation of banana seeds, dried and dried for 5 and 24 hours, packed in cryotubes containing liquid nitrogen (NL) and in cryotubes without NL; II - cryopreservation of banana seeds conditioned in cryotubes containing NL and without NL for seven days, followed by germination in a greenhouse. In the embryo rescue and in vitro culture, it was observed that banana seeds tolerate cryopreservation even without desiccation, and the treatment with 5 hours of desiccation without NL inside the cryotube was the one that obtained the highest percentage of germination. The regenerated plants were morphologically normal. However, in the greenhouse, the cryopreservation treatment with the direct contact of the seeds with NL provided the highest percentage of germination. It can be concluded that banana seeds can be cryopreserved with water content varying from 7.86 to 11.13. In addition, the in vitro culture of embryos provides a higher percentage of germination than sowing in greenhouse.

Key-words: Desiccation; *Musa* spp.; liquid nitrogen; embryo rescue

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Importância da bananicultura.....	6
Melhoramento genético da bananeira.....	7
Resgate e cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	9
Conservação de sementes.....	10
Criopreservação de sementes.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
Material genético vegetal.....	13
Determinação do teor de água	13
Experimento I: Criopreservação, resgate e cultivo <i>in vitro</i> de embrião de sementes de banana.....	16
Experimento II: Germinação de semente de banana em casa de vegetação.....	17
Análises estatísticas.....	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
Experimento I: Criopreservação, resgate e cultivo <i>in vitro</i> de embrião de sementes de banana.....	18
Experimento II: Germinação de semente de banana em casa de vegetação.....	27
CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXOS.....	39

INTRODUÇÃO

A bananicultura é uma atividade agrícola de relevância econômica e social para agricultores de regiões tropicais. A banana apresenta propriedades nutricionais, como minerais e vitaminas, que a tornam um alimento completo, sendo incluída entre os recursos fitogenéticos para a alimentação e a agricultura mundialmente importantes para a segurança alimentar.

Esta cultura está vulnerável à ocorrência de doenças que podem levar a perdas substanciais de produção como a Sigatoka negra e Mal do Panamá (especialmente a raça tropical 4 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*). A geração de novas cultivares resistentes às principais doenças mediante o melhoramento genético constitui o método mais efetivo para garantir o futuro da bananeira.

Embora as principais cultivares de bananeira sejam triploides e partenocárpicas (produzem frutos sem que haja fecundação dos óvulos e, portanto, não apresentam a formação de sementes), é possível obter sementes para alguns genótipos triploides que apresentam diferentes níveis de esterilidade. As hibridações entre genótipos diploides e entre diploides e tetraploides podem gerar um elevado número de sementes, sendo necessário o armazenamento destas em condições que permitam a manutenção de sua viabilidade.

Assim, a criopreservação se torna uma estratégia interessante para o armazenamento de sementes, uma vez que constitui um método de conservação de material genético biológico vegetal ou animal a temperaturas ultra baixas (-196 °C) por períodos longos em que os processos físicos e bioquímicos são estabilizados (PANIS e LAMBARDI, 2005). Além de apresentar longevidade de conservação, a criopreservação apresenta outras vantagens, como o baixo custo de armazenamento, espaço físico reduzido e baixa possibilidade de contaminação por fungos e bactérias (REIS e CUNHA, 1997; VINEESH et al., 2015).

Para que a técnica da criopreservação de sementes seja realizada com sucesso é necessário o conhecimento da quantidade de água presente no interior da semente, uma vez que, o excesso de água pode ocorrer à formação de cristais de gelo

no interior das células resultando na ruptura da membrana celular (PRITCHARD e NADARAJAN, 2008).

No gênero *Musa* a germinação de semente é variável devido as barreiras físicas, fisiológicas e genéticas (CHIN, 1996; AHMED et al., 2006). O teor de água em sementes de bananeira pode variar de 30 a 45% e quando dessecadas a 20°C pode reduzir o seu teor de água para 10%, isso a depender da espécie (CHIN, 1996).

Em bananeira, a conservação de sementes é preferível para cultivares diploides, uma vez que estes possuem alta taxa de fertilidade e produção de sementes viáveis, além de características desejáveis como resistência a doenças e pragas que podem ser utilizadas em programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares comerciais triploides e tetraploides com características de interesse, como resistência a doenças.

Estudos direcionados a criopreservação de sementes com interesse econômico estão sendo cada vez mais realizados com intuito da preservação, melhoramento genético e manutenção de estoques para o uso futuro dos recursos genéticos.

Este estudo é um trabalho inédito que tem objetivo de investigar a germinação *in vitro* e em casa de vegetação de sementes de bananeira criopreservadas em contato direto e indireto com o nitrogênio líquido, visando à adequação de condições para criopreservar as sementes.

REVISÃO DE LITERATURA

A bananeira é uma planta herbácea e monocotiledônea, pertencente à família Musaceae e gênero *Musa*, sendo representada por 33 espécies (HAKKINEN, 2013). O centro de origem da *Musa* spp. situa-se no Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico, sendo que foi introduzida em outros locais como na África, nas Américas e no Sul do Pacífico (SIMMONDS, 1962; DE LANGHE et al., 2009; MATHEW e NEGI, 2017).

A domesticação da bananeira foi determinada por duas alterações importantes: a ocorrência de partenocarpia em decorrência de hibridações naturais e mutações em *Musa acuminata* e a perpetuação de plantas estéreis mediante a propagação vegetativa. Estas duas características foram selecionadas pelo homem, dando origem a cultivares estéreis e a produção de frutos comestíveis (SIMMONDS e SHEPHERD, 1955).

As bananeiras que apresentam frutos comestíveis são oriundas das espécies de *M. acuminata* (genoma A) ou do cruzamento desta com *M. balbisiana* (genoma B), as quais apresentam três níveis cromossômicos, a saber: diploide (2x), triploide (3x) e tetraploide (4x), todos múltiplos do número básico de cromossomos $n=11$ (SIMMONDS, 1962; SHEPHERD et al., 1984).

As cultivares de bananeira são partenocárpicas em decorrência de hibridações e mutações (DAYARANI et al., 2011). A formação do fruto comestível é resultado da ocorrência de partenocarpia, ou seja, do desenvolvimento do ovário sem ocorrer a fecundação do óvulo, resultando na ausência de sementes (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955; ORTIZ; VUYLSTEKE, 1995; DAYARANI et al., 2011). As estruturas pequenas de coloração escura observadas no interior do fruto não são sementes e sim óvulos não fertilizados que foram abortados (DAYARANI et al., 2011).

As sementes de bananeira apresentam características que variam muito dependendo da espécie, de forma achatada, coloração variável e podendo atingir entre três e seis milímetros de diâmetro. As sementes são constituídas por uma membrana escariosa na qual recobre a casca, tornando-a excessivamente rígida. O embrião é uma estrutura pequena (Figura 1), em forma de cogumelo, localizada abaixo do opérculo da semente (CHIN, 1996; GRAVEN et al., 1996).

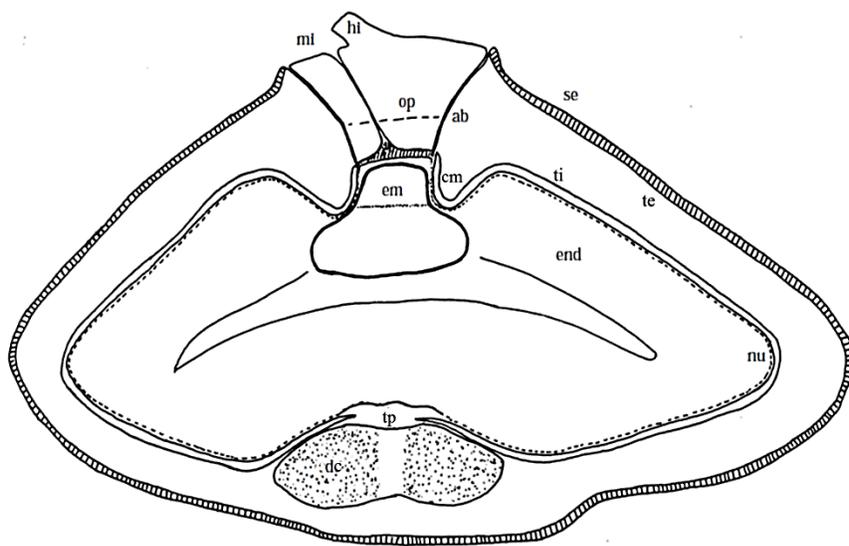


Figura 1. Desenho esquemático de um corte longitudinal da semente de banana. ab, camada de abscisão; cm, colar micropilar; dc, disco chalazal; em, embrião; end, endosperma; hi, hilo; mi, micropila; nu, tecido nuclear; op, opérculo; se, silicificado exotesta; te, tegumento externo; ti, tegumento interno; tp, tecido parenquimatoso entre a chalaza e o nucelo. Adaptado de Graven et al. (1996).

Em angiospermas, as sementes são classificadas de acordo com o seu comportamento perante o armazenamento, como ortodoxas e recalcitrantes (ROBERTS, 1973). As sementes ortodoxas são aquelas que toleram a dessecação e podem ser armazenadas dessecadas por um longo período de tempo. Estas sementes podem suportar a desidratação a aproximadamente 5 % ($0,53 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1}$ material seco). Em contrapartida, as sementes recalcitrantes são aquelas que possuem elevado teor de água e metabolismo ativo (elas se deterioram na desidratação) e não podem ser armazenadas por longos períodos de tempo (ANGELOVICI et al., 2010). Tem sido observado que certas sementes não se conformam totalmente ou a categoria ortodoxa ou recalcitrante. Algumas dessas sementes podem ter uma tolerância de dessecação limitada, mas são sensíveis a temperaturas de congelamento. Para estas sementes, uma categoria intermediária foi sugerida por Ellis et al. (1990). As sementes intermediárias são relativamente tolerantes à dessecação, mas não suportam a remoção de água para níveis tão baixos quanto as sementes ortodoxas. Elas

sobrevivem dessecação a cerca de 10% MC (base de peso fresco) e geralmente podem ser armazenadas por períodos de médio prazo. Tais sementes são frequentemente sensíveis a baixas temperaturas, mesmo desidratadas (MASETTO et al., 2008).

Essa distinção no comportamento das sementes pode ser atribuída como decorrência do processo de seleção natural, juntamente com as condições em que a semente se desenvolveu (BARBEDO e MARCOS FILHO, 1998).

Em *Musa* spp., as sementes frescas possuem um elevado teor de água, que varia de 30 a 45 %, podendo ainda apresentar dormência após processos de secagem (CHIN, 1996).

A dormência é uma propriedade inata da semente que define as condições do ambiente nas quais a semente é capaz de germinar (FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006), sendo considerada uma adaptação da semente ao meio ambiente para evitar a germinação em condições desfavoráveis (TAIZ et al., 2017).

A dormência nas sementes de bananeira é causada por algumas barreiras, como: físicas, que incluem impermeabilidade do embrião e rigidez do tegumento; morfológica, caracterizada devido à carência ou ao crescimento inadequado do tegumento do embrião e do endosperma; e fisiológica, que está relacionada ao desequilíbrio ou inibição por substâncias de crescimento (BASKIN e BASKIN, 2004; DAYARANI et al., 2011).

A superação da dormência em sementes de bananeira pode ocorrer através da extração direta do embrião da semente e cultivo *in vitro* (resgate de embrião) ou por métodos de estratificação (tratamento úmido à baixa temperatura, para auxiliar as sementes na maturação do embrião, nas trocas gasosas e na embebição pela água) e escarificação química (feita geralmente com ácidos sulfúrico, clorídrico etc.) ou mecânica (abrasão das sementes sobre uma superfície áspera) para facilitar a absorção de água pela semente e trocas de gases com o meio envolvente (STOTZKY e COX, 1962; UMA et al., 2011).

Em bananeiras a germinação de sementes ocorre entre três e seis semanas sob condições naturais (NWAUZOMA e MOSES, 2013). Porém, algumas dessas condições limitam a germinação, como à falta de água para a embebição e a troca de gases pela

semente, deformação no embrião, ausência de endosperma ou do embrião e na maturidade das sementes no momento da colheita e da idade fisiológica (GRAVEN et al., 1996; UMA et al., 2011; VINEESH et al., 2015).

Importância da bananicultura

A bananicultura destaca-se como uma atividade agrícola de grande importância nutricional e socioeconômica sendo considerada a base alimentar para milhões de pessoas, e, geralmente, cultivada por pequenos agricultores nos países tropicais e subtropicais (TENKOUANO et al., 2011; AMORIM et al., 2016).

A banana, assim como o arroz, o trigo e o milho são considerados como as fontes alimentares mais importantes e consumidas do mundo (PERRIER et al., 2011). Os frutos da bananeira são utilizados de forma in natura ou processados, como doces, chips e polpas (AMORIM et al., 2016).

A produção mundial de banana foi de aproximadamente 106 milhões de toneladas. No Brasil, a produção da fruta foi de 6,9 milhões de toneladas, em aproximadamente 461 mil hectares (IBGE, 2018).

A banana é cultivada em todo Brasil sendo que o nordeste do país se destaca como o maior produtor, responsável por aproximadamente 41% da produção nacional seguido pelo Sudeste (30%) (AMARO, 2016). As cultivares mais consumidas pelos brasileiros são: Prata, Grande Naine, Pacovan, Maçã e Terra (AMORIM et al., 2016).

Entretanto, a produção tem sido relativamente limitada pela ocorrência de doenças como o mal do Panamá, a Sigatoka amarela e a Sigatoka negra, que podem causar até 100% de perda da produção, a depender da cultivar e ou condições de cultivo. As cultivares mais conhecidas (Prata, Pacovan, Maçã, Grande Naine e Terra) são muito suscetíveis à Sigatoka-negra e, à exceção da Terra e Maçã, são também suscetíveis à Sigatoka-amarela (AMORIM et al., 2016).

Com relação ao Mal do Panamá, as cultivares Grande Naine e Terra, são resistentes, a Maçã é altamente suscetível e as demais cultivares são medianamente suscetíveis (SILVA et al., 2002). Uma das estratégias para a solução dos problemas mencionados é a criação de novas variedades por meio do melhoramento genético.

Melhoramento genético da bananeira

O melhoramento genético vegetal visa à seleção de genes superiores que apresentem características de interesse, por meio de técnicas, estratégias ou recursos que possam resultar em características economicamente importantes (SILVA et al., 2013).

O programa de melhoramento genético da bananeira desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura visa à obtenção de cultivares com potencial agrônômico, resistentes às principais doenças (causadas por fungos, bactérias e vírus), pragas, nematoides e que apresentem frutos palatáveis e com boas características pós-colheita (AMORIM et al., 2013).

A principal estratégia utilizada para desenvolver novas cultivares é o melhoramento convencional mediante hibridações. A primeira etapa do programa se refere à obtenção diploides melhorados que reúnam características de interesse como a resistência a doenças, tamanho dos frutos, número de pencas, entre outras. Nesta etapa os acessos diploides disponíveis no banco de germoplasma de bananeira tem sido amplamente utilizados.

Vale ressaltar que o Banco Ativo de Germoplasma de Banana da Embrapa Mandioca e Fruticultura foi iniciado em 1976 mediante coleta e intercâmbio e que atualmente contém 369 acessos entre espécies selvagens e cultivares (diploides, triploides e tetraploides) e reúne uma variabilidade representativa do gênero *Musa* (SANTOS-SEREJO et al., 2016).

Como resultado destes cruzamentos um volume elevado de sementes é obtido. Devido à falta de disponibilidade de área experimental para avaliar todos os híbridos obtidos, somente uma amostra das sementes das diferentes progênies são germinadas e levadas a campo onde é feita a seleção dos melhores genótipos. O restante das sementes é armazenado em geladeira para utilização futura.

Os diploides melhorados selecionados são utilizados para o cruzamento com as cultivares triploides, para geração de cultivares tetraploides (AMORIM et al., 2016). Entretanto, esta segunda etapa do melhoramento genético da bananeira tem sido

dificultada pela baixa produção de sementes em cultivares triploides comerciais quando em cruzamentos com diploides (SILVA et al., 2013).

Enquanto nas bananeiras diploides selvagens ocorre à produção de sementes férteis e viáveis que podem permanecer dormentes por longos períodos ou germinarem dependendo dos fatores climáticos, fisiológicos e genéticos (CHIN, 1996), nas cultivares triploides não ocorre a formação de sementes, a exemplo da cultivar Grande Naine (AAA), ou ocorre formação de sementes com baixa frequência em algumas cultivares como a Prata (AAB) e a Pacovan (AAB) (AMORIM et al., 2016). Estas sementes são submetidas ao resgate de embrião para a recuperação do número maior possível de híbridos.

O cruzamento entre uma cultivar triploide com um diploide resulta em um tetraploide devido à ocorrência de não disjunção no gameta feminino, ficando o gameta feminino com a mesma constituição da mãe (triploide). Assim, quando ocorre a fertilização com gameta masculino (haploide) é obtido um híbrido tetraploide (SANTOS-SEREJO et al., 2016).

Durante os últimos anos, a Embrapa Mandioca e Fruticultura desenvolveu as seguintes cultivares tetraploides por meio de hibridização: BRS Caprichosa, BRS Garantida, BRS Japira, BRS Pacovan Ken, BRS Preciosa, BRS Princesa, BRS Tropical, BRS Vitória, BRS Pacoua, BRS Pioneira e BRS Platina (AMORIM et al., 2013; 2016). As cultivares tetraploides apresentam boas características agronômicas e resistência às principais doenças, entretanto, algumas apresentam características que ainda podem ser melhoradas como o tamanho dos frutos e a ocorrência de despencamento dos frutos. Assim, mais recentemente tem sido implementada uma terceira etapa no melhoramento convencional que constitui no cruzamento das cultivares tetraploides com diploides melhorados visando a obtenção de híbridos triploides (AMORIM et al., 2016).

Nestes cruzamentos, como a meiose é regular em ambos os parentais e a fertilização ocorre normalmente, um grande número de sementes é obtido e, à semelhança do que é feito com as sementes obtidas nos cruzamentos entre diploides, apenas uma amostra das sementes é germinada e o restante é armazenado a 8°C.

Outra estratégia que tem sido utilizada no programa de melhoramento é a indução de duplicação de cromossomos de genótipos diploides partenocárpico (AA) e posterior cruzamento do autotetraploide (AAAA) obtido com um diploide melhorado para a geração de triploides secundários AAA. Diversos agentes antimitóticos têm sido testados para induzir a duplicação dos cromossomos *in vitro* como a colchicina, orizalina, amiprofos-metil (APM) e cafeína (COSTA et al., 2011; AMARAL et al., 2015; BORGES et al., 2016).

Os autotetraploides que foram avaliados em campo apresentaram boas características agronômicas e, embora o diploide original seja partenocárpico (não produz sementes), no autotetraploide ocorreu a restauração da fertilidade e um número elevado de sementes foi obtido (AMARAL et al., 2015).

Devido à limitação de mão de obra e de espaço no campo experimental para plantio e avaliação de todas as plantas oriundas das sementes obtidas no programa de melhoramento da bananeira, amostras de sementes são semeadas em casa de vegetação e/ou submetidas à técnica de resgate de embrião, e os lotes de sementes restantes são armazenados em sacos plásticos a aproximadamente 8°C em geladeira para uso futuro.

Resgate e cultivo *in vitro* de embriões

O resgate de embrião é uma técnica em que o embrião é excisado da semente e cultivado *in vitro* em meio de cultura contendo macro e micronutrientes e suplementados com sacarose, sais minerais, vitaminas e reguladores vegetais para estimular o desenvolvimento de plântulas normais (HU e FERREIRA, 1998).

Essa prática consiste em uma ferramenta da cultura de tecidos vegetais que tem por finalidade resgatar os embriões e proporcionar a superação da dormência de sementes e regeneração de plântulas (UMA et al., 2011). O resgate de embriões reduz o período de germinação, podendo ser observada a evolução do desenvolvimento do embrião em um curto espaço de tempo a partir da introdução em meio de cultura (BAKRY, 2008).

Existem várias aplicações do resgate e cultivo de embriões, dentre elas destacam-se a criopreservação, a superação de dormência, aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento dos embriões, teste da viabilidade das sementes, entre outros (WEN e WANG, 2010).

A técnica de resgate de embriões tem sido corriqueiramente utilizada para fruteiras como o açazeiro (LEDO et al., 2001), videira (AMARAL et al., 2001), mamoeiro (SOUZA et al., 2011).

Embora o melhoramento genético por hibridação tenha alcançado sucesso para várias cultivares de bananeira, a quantidade de sementes ainda é bastante reduzida, especialmente em hibridações onde o parental feminino é triploide. Logo, o resgate de embriões em bananeira tem permitido o aumento da percentagem de germinação de sementes e a avaliação de maior número de plantas originadas de novos cruzamentos (PANCHOLI et al., 1995).

Conservação de sementes

A conservação de sementes consiste no armazenamento em condições que favoreçam a manutenção das condições fisiológicas e físicas retardando seu envelhecimento (deterioração) e visando seu uso no futuro (BARBEDO e MARCOS FILHO, 1998).

O armazenamento de sementes apresenta alguns entraves devido às condições climáticas serem adversas, acelerando o processo de deterioração da semente, acarretando na redução do vigor e conseqüentemente a sua capacidade de germinação (WETZEL et al., 2003).

Vários estudos têm sido realizados para a conservação da viabilidade de sementes ao longo dos anos. Esses estudos se baseiam em condições controladas de umidade e de temperatura para averiguar os motivos que interferem na germinação (ABDELNOUR-ESQUIVEL et al., 1992; CHIN, 1996; AHMED, 2006). A dessecação das sementes é um dos fatores que podem intervir na longevidade da semente, sendo assim uma etapa decisiva que antecede o armazenamento. A dessecação das sementes de forma natural tem um custo reduzido, porém, a variação na intensidade da

sombra ou posição do sol pode afetar a germinação. Já na dessecação artificial podem-se utilizar agentes desidratantes como sais e sílica em gel, além de equipamentos como estufa e dessecador (PAMMENTER et al., 2002).

As sementes podem ser conservadas em câmaras frias e secas, contudo, a instalação e a manutenção destas câmaras são dispendiosas. Além disso, este tipo de conservação apenas adia o envelhecimento por um determinado período de tempo, sendo recomendado o uso de bancos criogênicos (ALMEIDA et al., 2002).

Criopreservação de sementes

Com os avanços relacionados à elaboração de novas técnicas para preservação dos recursos genéticos, a criopreservação, tornou-se um método bastante propício.

A criopreservação é considerada uma maneira segura de conservação em longo prazo de sementes, embriões, ápices caulinares, gemas laterais, calos, entre outros (REED, 2008). A técnica da criopreservação consiste no armazenamento do material biológico em nitrogênio líquido -196 ou -150 °C na fase de vapor. Essa técnica reduz o metabolismo celular paralisando todos os processos bioquímicos e, assim, retardando a deterioração biológica (KARTHA, 1985).

No entanto, as células têm alto volume de água deixando-as extremamente sensíveis ao congelamento, sendo imprescindível a desidratação artificial a fim de protegê-las das injúrias causadas durante a criopreservação (MAZUR, 1969). É válido ressaltar que, caso esta desidratação ocorra em excesso, também ocasiona a morte celular e quando o teor de água no interior da célula é considerado ideal, proporciona plasticidade e evita o rompimento da estrutura física celular (MATA, 2008).

Para que a criopreservação seja bem sucedida é necessário que não ocorra à formação de cristais de gelo no interior da célula, pois, pode resultar na ruptura da membrana celular, o que impossibilita o resgate do material congelado (GONZALEZ-ARNAO et al., 2000). Sendo assim, o estabelecimento de um protocolo de criopreservação demanda de conhecimento aprofundado dos mecanismos biológicos integrados com a resposta do tecido à desidratação e ao descongelamento (STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995).

Várias técnicas de criopreservação em plantas estão sendo estudadas, dentre elas destacam-se o método clássico, que consiste no resfriamento lento até uma temperatura de congelamento estipulada, seguida de imersão rápida em nitrogênio líquido; e a vitrificação, que consiste na desidratação do material biológico antes do congelamento por exposição a meios crioprotetores concentrados de sacarose e outras substâncias químicas como alginato e PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*) ou a dessecação, seguido do resfriamento rápido (ENGELMANN, 1997).

Nos últimos anos a criopreservação tem sido aplicada para a conservação de plantas com importância econômica, por exemplo para embrião zigótico: milho (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum* spp.), café (*Coffea arabica* L.), citros (*Citrus sinensis* L. (Osb.), banana (*Musa* spp.), coco (*Cocos nucifera* L.) e para semente de maracujá (*Passiflora*), ipê amarelo (*Tabebuia chrysostrica* (Mart. Ex. DC.) Standl.) e romã (*Punica granatum* L.) (BAJAJ, 1983; DELVALLÉE et al., 1989; PANIS et al., 1990; ABDELNOUR et al., 1992; ABDELNOUR-ESQUIVEL et al., 1992; ASSY-BAH e ENGELMANN, 1992; STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995; TRESENA, 2010; VEIGA-BARBOSA, 2013; SILVA, 2015).

Além de a criopreservação manter a viabilidade por anos, ela também se destaca por ocupar um espaço reduzido sem a necessidade de eletricidade ou sistema de refrigeração e simplicidade na manipulação do reabastecimento do botijão de nitrogênio líquido.

A manutenção da viabilidade do material criopreservado é bastante almejada na conservação de germoplasma. Deste modo, um sistema de conservação em longo prazo de material vegetal precisa ser desenvolvido para espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias e propagadas vegetativamente.

Alguns fatores limitam a utilização rotineira da criopreservação em algumas culturas, visto que a sobrevivência e regeneração do material criopreservado, segundo Santos (2001), dependem de fatores como tamanho, estágio de desenvolvimento do material, desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração. Entre estes fatores, o processo de desidratação é um dos pontos mais cruciais para a sobrevivência dos tecidos vegetais submetidos à criopreservação.

Uma vez que teores de umidade muito baixos levam à desidratação excessiva e morte das células, e aqueles elevados levam à formação de cristais de gelo no interior das células e conseqüentemente, as células terminam por sofrer danos físicos, como por exemplo, a ruptura do sistema de membranas celulares, perda da permeabilidade seletiva das células e compartimentalização destas.

A ocorrência da morte celular por desidratação excessiva ocorre porque quando a água é removida das células, há uma maior concentração de solutos podendo aumentar a taxa de reações químicas destrutivas. Além disso, segundo Kramer e Boyer (1995), alguns solutos podem cristalizar-se, mudando o potencial iônico e o pH da solução intracelular, alterando assim o status metabólico da célula.

Este estudo é um trabalho inédito que tem objetivo de investigar a germinação *in vitro* e em casa de vegetação de sementes de bananeira criopreservadas em contato direto e indireto com o nitrogênio líquido, visando à adequação de condições para criopreservar as sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético vegetal

Foram utilizadas sementes de onze genótipos de banana coletadas no Campo Experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Tabela 1). As sementes foram retiradas de frutos maduros, despulpados e embebidas em água por 24 horas para auxiliar na retirada da mucilagem. Em seguida, foi utilizado o método de flutuação em água (BRASIL, 2009) para determinar a viabilidade das sementes que flutuaram foram descartadas e as que afundaram foram submetidas à secagem em temperatura ambiente para serem utilizadas no estudo. Para este estudo foram realizados dois experimentos: Experimento I: criopreservação, resgate e cultivo *in vitro* de embrião de sementes de banana; e Experimento II: criopreservação e germinação de sementes de banana em casa de vegetação.

Determinação do teor de água

O teor de água das sementes foi determinado pelo método de dessecação em estufa a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009). Foram utilizadas três repetições contendo 10 sementes cada, para o cultivo *in vitro* e 20 sementes cada para a germinação em casa de vegetação. Para determinar o teor de água, as amostras foram pesadas e submetidas à dessecação, utilizando a fórmula abaixo:

$$TA = \frac{MA}{Pi} \times 100$$

Sendo:

TA: Teor de água (%);

MA: Massa de água, dada pela diferença entre o peso inicial e o peso final (g);

Pi: Peso inicial (g).

Tabela 1. Parentais femininos e masculinos dos cruzamentos que forneceram as sementes de bananeira utilizadas no estudo, e respectivas constituições genômicas. O parental masculino foi considerado indeterminado no caso de polinizações abertas.

Experimento	Código Genótipo	Parental feminino	Constituição genômica	Parental masculino	Constituição genômica
I. Cultivo <i>in vitro</i>	1	Madu	AA	indeterminado	-
	2	001016-01*	AA	indeterminado	-
	3	Thong Dok Mak-10	AAAA	indeterminado	-
	4	BRS Princesa 1	AAAB	IAC1	AA
	5	BRS Princesa 2	AAAB	Calcutta 4	AA
II. Casa de vegetação	A	Birmanie	AA	indeterminado	-
	B	Madu	AA	indeterminado	-
	C	001016-01*	AA	indeterminado	-
	D	058054-03*	AA	indeterminado	-
	E	086079-09*	AA	indeterminado	-
	F	091079-03*	AA	indeterminado	-
	G	Thong Dok Mak-2	AAAA	indeterminado	-
	H	BRS Princesa 3	AAAB	013018-01*	AA

*Diploides melhorados: 001016-01 (Borneo x Guyod); 013018-01 (Malaccensis x Sinwobogi); 058054-03 [(Calcutta 4 x Pahang) x (Borneo x Madang)]; 086079-09 [(Calcutta 4 x Galeo) x (Tuugia x Calcutta 4)]; 091079-03 [(Borneo x Guydo) x (Tuugia x Calcutta 4)].

Experimento I: Criopreservação, resgate e cultivo *in vitro* de embrião de sementes de banana

Sementes de banana foram submetidas a nove tratamentos (Tabela 2) de dessecação e criopreservação em nitrogênio líquido (NL). Para realizar a dessecação, foi utilizado um dessecador contendo sílica e dois intervalos de tempos de dessecação de 5 e 24 horas. Em seguida, as sementes, sem desinfestação prévia, foram submetidas à criopreservação em NL, sendo que foi avaliado o efeito do contato direto das sementes com o NL (NL dentro do criotubo) e indireto (sem NL dentro do criotubo).

Tabela 2: Tratamentos das sementes de banana submetidas à dessecação e criopreservação em nitrogênio líquido (NL).

Tratamento	Descrição
T1	Testemunha (sem dessecação e sem criopreservação em NL)
T2	Dessecação por 5 horas
T3	Dessecação por 24 horas
T4	Sem dessecação + criopreservação sem NL dentro do criotubo
T5	Sem dessecação + criopreservação com NL dentro do criotubo
T6	Dessecação por 5 horas + sem NL dentro do criotubo
T7	Dessecação por 5 horas + com NL dentro do criotubo
T8	Dessecação por 24 horas + sem NL dentro do criotubo
T9	Dessecação por 24 horas + com NL dentro do criotubo

Após o período de sete dias de criopreservação das sementes em NL, foi realizado o descongelamento mediante lavagem em água corrente. Em seguida, foi realizado o processo de desinfestação, em condições assépticas, que consistiu na imersão em álcool a 70% por 5 minutos, seguida de imersão em 2,5 % de cloro ativo (v/v) por 30 minutos, finalizando com uma tríplice lavagem com água destilada estéril.

Após a desinfestação foi realizado o resgate dos embriões que consistiu na excisão dos embriões das sementes, seguido pelo cultivo *in vitro*. Para o resgate de embriões foram selecionados apenas embriões normais.

Os embriões foram introduzidos em placas de Petri (25 x 100 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,6 g L⁻¹ de Phytigel[®], com pH ajustado para 5,8 e autoclavado durante 20 min a 121 °C. Em seguida, as placas foram incubadas em câmara de crescimento sob condições de escuro e a temperatura de 26 ± 2°C. A avaliação da taxa de germinação foi realizada após 45 dias da introdução dos embriões no meio de cultura. Foram considerados como germinados os embriões que emitiram a radícula.

Após a emissão da radícula os embriões foram transferidos para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 15 mL do meio de cultura MS para desenvolvimento das plântulas que foram subcultivadas em condições de fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de 36 μmol.m⁻² s⁻¹ e temperatura de 26 ± 2°C.

Experimento II: Germinação de semente de banana em casa de vegetação

Para a germinação em casa de vegetação, foram utilizadas amostras de sementes de oito genótipos de banana (Tabela 1) submetidas a três tratamentos de criopreservação em nitrogênio líquido (NL): T1: Testemunha; T2: criopreservação com NL dentro do criotubo e T3: criopreservação sem NL dentro do criotubo. As sementes foram armazenadas por sete dias em NL. Foram utilizadas três repetições contendo 20 sementes cada.

Após a criopreservação, as sementes foram semeadas em casa de vegetação em bandejas de plástico (442 x 280 x 75 mm) contendo fibra de coco como substrato em condições de temperatura controlada (25°C ± 2). As bandejas foram subdivididas em seis quadrantes, sendo que cada um correspondeu a uma repetição para cada genótipo. A avaliação da taxa de germinação foi realizada durante 90 dias após a semeadura sendo considerado como germinada a emergência de plântula.

Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Para o experimento I foi utilizado um esquema fatorial triplo de 5 x 3 x 3

(Genótipos x Tempo de dessecação x Imersão em nitrogênio líquido). Para os experimentos I e II, os dados de germinação foram submetidos ao teste F da ANAVA

a 5% de significância, sendo que os dados de porcentagem foram transformados em arco seno $\sqrt{x}/100$ e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico R (R CORE TEAM, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Criopreservação, resgate e cultivo *in vitro* de embrião de sementes de banana

As sementes de banana utilizadas no presente estudo já haviam sido secas ao ar antes do início do estudo, assim, o teor de água nas sementes antes da dessecação em sílica variou de 10,21 a 14,97% (Tabela 3). Geralmente, em sementes de bananeira o teor de água pode variar de 30 a 45%, reduzindo para abaixo de 10% quando são secas a 20°C, dependendo do genótipo utilizado, no entanto, quanto maior o teor de água mais facilmente será a germinação (CHIN, 1996).

Tabela 3. Teor de água em sementes de cinco genótipos de bananeira após dessecação em sílica por 5 e 24 horas.

Genótipo* (Parental feminino)	Teor de água (%)		
	Controle	5 horas	24 horas
Madu	10,94	10,69	8,10
001016-01	11,11	9,48	6,77
Thong Dok Mak-10	13,06	11,92	3,25
BRS Princesa1	10,21	9,28	7,06
BRS Princesa 2	14,97	8,96	5,80

Quando submetidas a 5 horas de dessecação, ocorreu baixa perda de água e as sementes apresentaram teor de água de 8,96 a 11,92% (perda média de 15% do teor de água). Entretanto, ao submeter às sementes por 24 horas de dessecação observou-se que houve uma substancial perda de água para todos os genótipos (perda média de 46% do teor de água), com destaque para o autotetraploide Thong

Dok Mak-10 (TDM-10), que manteve 3,25 % de teor de água, com perda de cerca 75% do teor de água em relação ao controle.

O genótipo TDM-10 é um tetraploide obtido a partir de um diploide partenocárpico que teve sua fertilidade restaurada quando foi submetido ao processo de indução de duplicação de cromossomos *in vitro* mediante o uso de agentes antimitóticos (PIO et al., 2014). Embora tenha sido possível obter sementes do autotetraploide, foi observado que estas apresentaram embriões normais, mas de tamanho reduzido (Figura 1A).

Os embriões que foram cultivados *in vitro* começaram a intumescer (Figura 1B) após 10 dias de inoculação, ocorrendo à alteração na cor do embrião de branco para amarelado, a partir daí a radícula começou a se desenvolver, seguida pela emergência de raízes adventícias que apareceram juntamente com a primeira folha, independente do tratamento (Figura 1C-D). O desenvolvimento das plantas não mostrou nenhuma diferença morfológica quando comparadas as plantas do tratamento controle (Figura 1E).

As sementes de banana quando submetidas à dessecação nos tratamentos T2 (criopreservação com NL dentro do criotubo) e T3 (criopreservação sem NL dentro do criotubo), mas sem proceder à criopreservação, mostraram respostas diferentes entre os genótipos. De maneira geral, o fato de dessecar as sementes por 5 horas teve um efeito de estimular a germinação, independente da ploidia do parental feminino (Tabela 4).

Verificou-se que os genótipos 001016-01, TDM-10 e BRS Princesa 2 foram os que obtiveram maiores porcentagens de germinação quando dessecadas por 5 horas (T2), com valores de (56,67%), (13,34%) e (53,3%), respectivamente, significativamente superior ao tratamento controle onde os embriões de sementes não dessecadas foram excisados e cultivados diretamente no meio de cultura. Os Madu e BRS Princesa 1 não apresentaram diferença na taxa de germinação no tratamento T2 quando comparada com o controle (Figura 2).

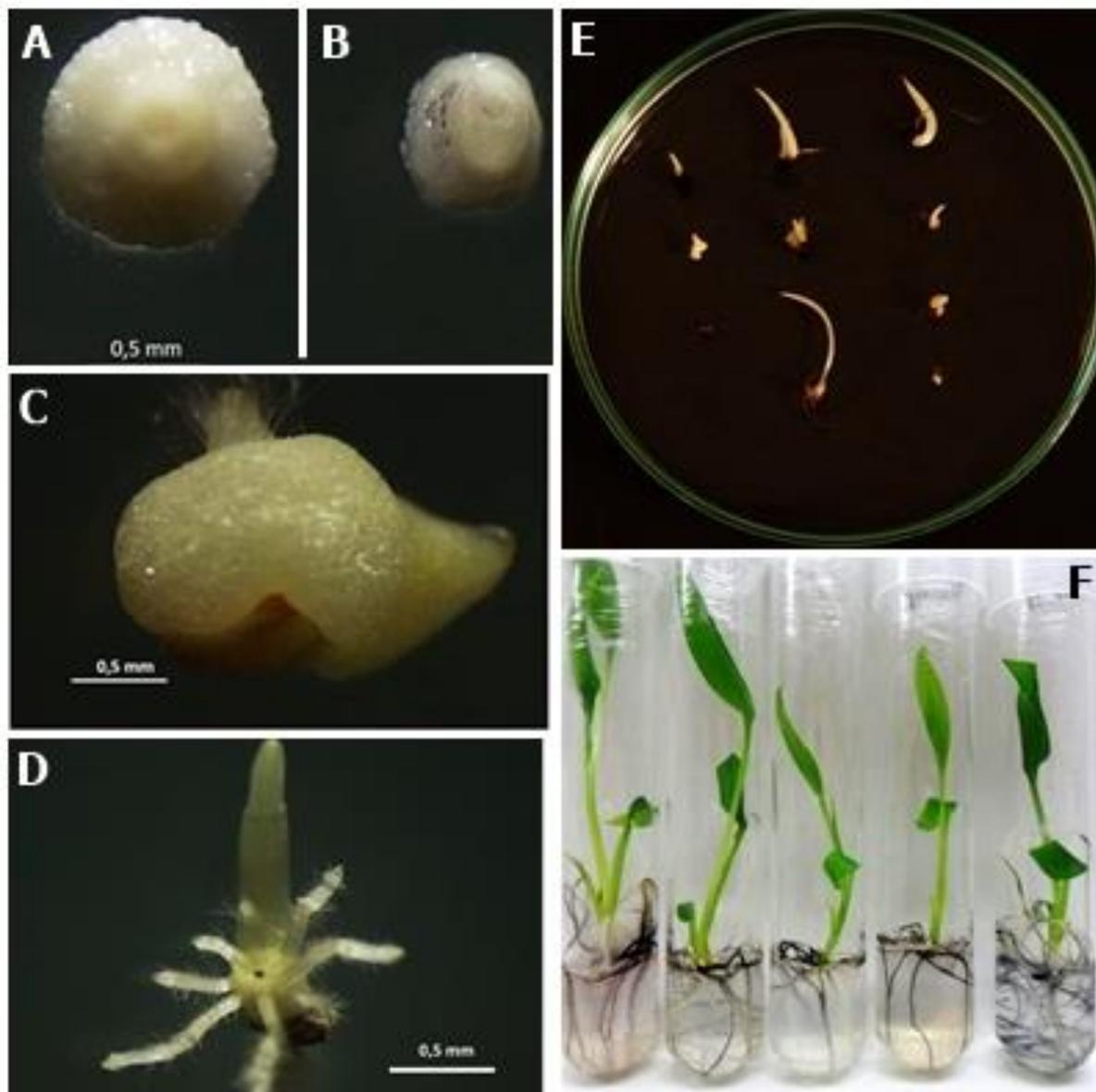


Figura 1: Resgate de embriões de bananeira e germinação *in vitro*. A) Embrião normal. B) embrião de tamanho reduzido observado em TDM-10; C-E) Embriões de bananeira cultivados *in vitro* após a criopreservação em nitrogênio líquido; E) Plântulas desenvolvidas *in vitro* após criopreservação.

Entretanto, quando foi feita a dessecação por 24 horas os genótipos os genótipos 001016-01 e TDM-10) apresentaram percentagem de germinação inferior ao controle. No caso do TDM-10, como os embriões eram de tamanho reduzido, é possível que a dessecação por 24 horas até um teor água de 3,25 % tenha sido muito drástica, limitando a germinação (Tabela 4, Figura 1-A).

Tabela 4. Valores médios de porcentagem de germinação *in vitro* dos embriões oriundos de sementes de genótipos de bananeira submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido.

Tratamento*	Genótipos (Constituição cromossômica do parental feminino)				
	Madu (AA)	001016-01 (AA)	Thong Dok Mak-10 (AAAA)	BRS Princesa 1 (AAAB)	BRS Princesa 2 (AAAB)
T1	20,00 dB	40,00 eA	10,00 bC	0,00 dD	20,00 eB
T2	40,00 bC	56,67 aA	13,34 aE	30,00 aD	53,30 aB
T3	40,00 bA	30,00 gB	3,34 dD	30,00 aB	26,67 cC
T4	3,34 eD	36,67 fA	3,34 dD	6,67 bC	20,00 eB
T5	40,00 bB	50,00 cA	3,34 dD	0,00 dE	26,67 cC
T6	80,00 aA	50,00 cB	0,00 eD	0,00 dD	30,00 bC
T7	20,00 dB	43,33 dA	6,67 cD	3,34 cE	13,34 fC
T8	26,67 cB	53,33 bA	3,34 dD	3,34 cD	23,34 dC
T9	0,00 eD	53,33 bA	6,67 cC	0,00 dD	20,00 eB

*T1: Testemunha; T2: Dessecação por 5 horas; T3: Dessecação por 24 horas; T4: Não dessecadas + criopreservação sem NL dentro do criotubo; T5: Não dessecadas + criopreservação com NL dentro do criotubo; T6: Dessecação por 5 horas + sem NL dentro do criotubo; T7: Dessecação por 5 horas + com NL dentro do criotubo; T8: Dessecação por 24 horas + sem NL dentro do criotubo; T9: Dessecação por 24 horas + com NL dentro do criotubo. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A água é um fator fundamental para o desenvolvimento das sementes e sua ausência ou excesso pode afetar o crescimento e o desenvolvimento em novas plantas, assim, a dessecação pode intervir diretamente no processo de germinação das mesmas. A dessecação é um dos fatores que contribuem na viabilidade da semente, sendo esta uma etapa decisiva para o armazenamento, uma vez que elas

necessitam alcançar um nível de umidade ideal para manterem a viabilidade (WETZEL et al., 2003).

A capacidade da semente de tolerar dessecação é vantajosa, uma vez que permite a sobrevivência por tempo prolongado em ambientes relativamente áridos (PAMMENTER e BERJAK, 2000), porém se o teor de água estiver abaixo do ideal para cada espécie a germinação não ocorre (HILL et al., 2010).

A redução do conteúdo de água no tecido é crucial para a redução da ocorrência de injúrias nos tecidos durante o congelamento. Segundo Panis (2009) um teor de água em torno de 14% é ideal para a criopreservação de embriões de banana.

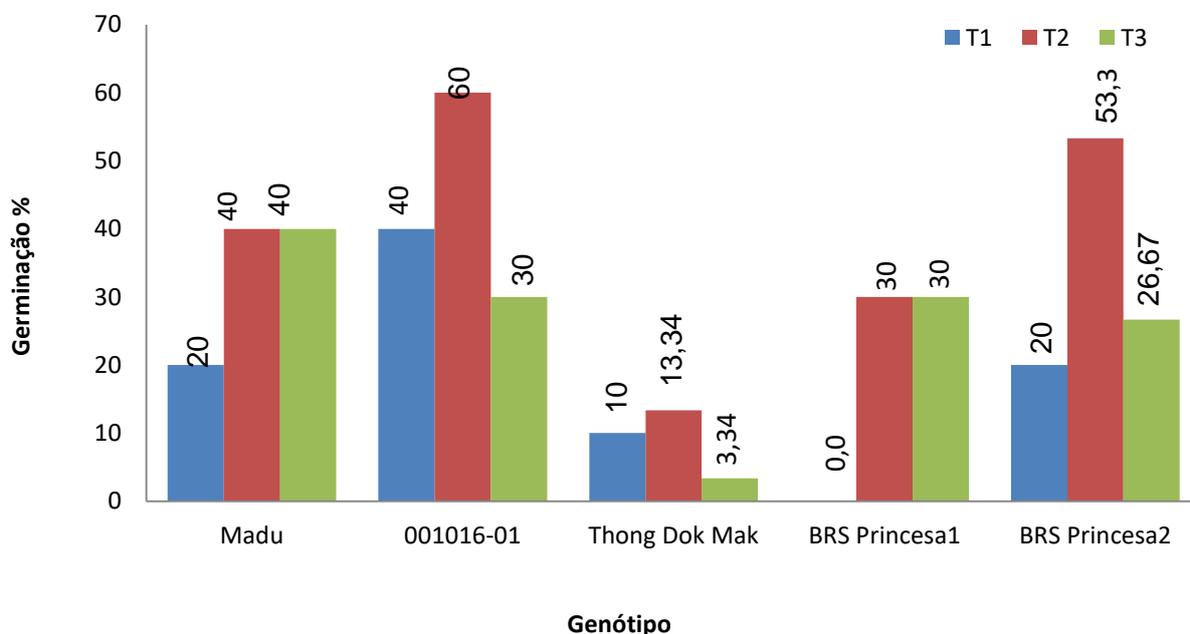


Figura 2. Valores médios de porcentagem de germinação *in vitro* de embriões excisados de sementes de bananeira submetidos à diferentes intervalos de dessecação. T1: Testemunha; T2: Sementes desseccadas por 5 horas; T3: Sementes desseccadas por 24 horas.

Com relação ao efeito do contato direto da semente com o nitrogênio líquido (NL dentro do criotubo) e do contato indireto (sem NL dentro do criotubo), foi observado que as sementes não desseccadas que foram colocadas em criotubos contendo NL (T5) apresentaram porcentagem de germinação superior ao controle (T1), exceto para os genótipos Thong Dok Mak-10 e BRS Princesa 1 (Tabela 4).

Este comportamento pode ser atribuído à superação de dormência pela submissão da semente à ultrabaixa temperatura. Quando analisada a porcentagem de germinação entre os genótipos, observou-se que o genótipo 001016-01 obteve maior porcentagem (50%) quando comparado com demais genótipos (Figura 3).

A ocorrência de dormência em sementes de bananeira é um assunto ainda em discussão. Enquanto, alguns estudos indicam que não ocorre dormência física (SIMMONDS, 1959; GRAVEN et al., 1996; BASKIN et al., 2000), outros afirmam que sementes de *Musa* apresentam algum grau de dormência física, ou seja, tegumento com impermeabilidade à água (CHIN 1996; ASIF et al., 2001; FINCH-SAVAGE e LEUBNER-METZGER, 2006; UMA et al., 2011).

O controle do genótipo BRS Princesa1 não germinou, o que pode ser atribuído à dormência da semente. Entretanto, após a criopreservação sem contato direto das sementes com o nitrogênio líquido, houve 6,67% de germinação, o que sugere que de alguma forma o congelamento proporcionou uma quebra de dormência da semente. Segundo Burgos-Hernández et al. (2014) o grau de dormência de sementes de bananeira parece ser uma característica genótipo dependente.

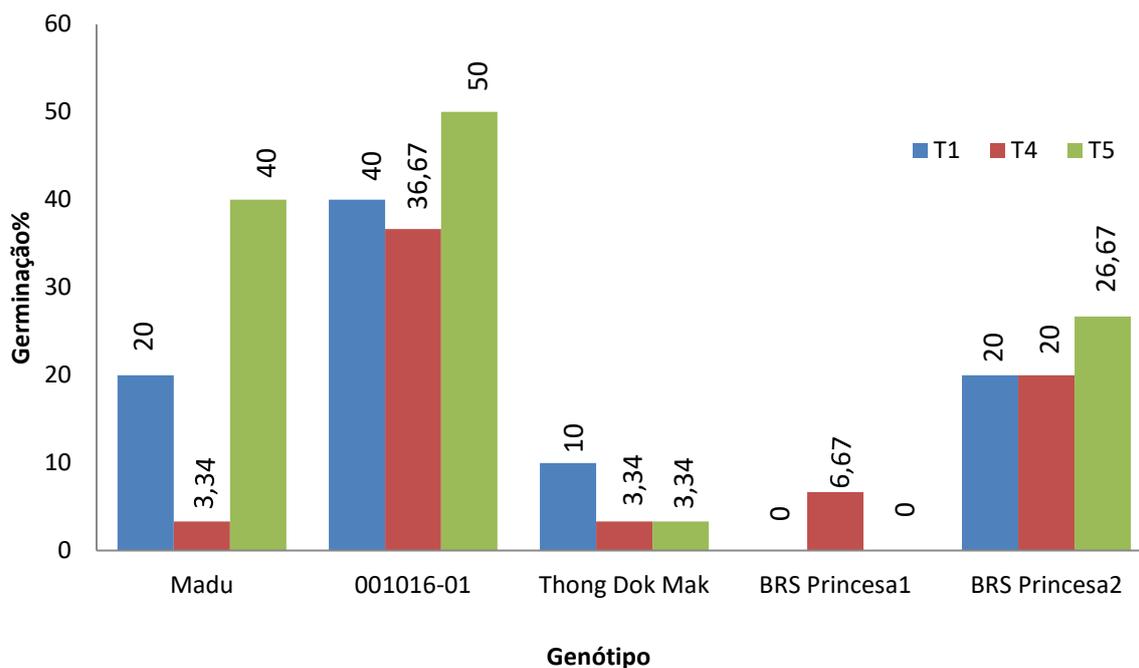


Figura 3: Valores médios de percentagem de germinação *in vitro* de embriões excisados de sementes de bananeira submetidos à criopreservação em nitrogênio líquido (NL), T1: Testemunha; T4: Sem dessecação + criopreservação sem NL dentro do criotubo; T5: Sem dessecação + criopreservação com NL dentro do criotubo.

Em todos os genótipos o nitrogênio líquido apresentou taxa de germinação superior ao controle, o que mostra que esse tratamento pode ser utilizado como uma técnica para conservação e para aumentar a taxa de germinação.

A temperatura pode afetar a percentagem de germinação das sementes mediante seu efeito na viabilidade da semente (KEBREAB e MURDOCH, 1999), podendo causar a aceleração da deterioração e perda da viabilidade, ou, por outro lado, ter um efeito na superação da dormência e manutenção da viabilidade.

Os dados obtidos no presente estudo corroboraram Ellis (1991) e Chin (1996), de que as sementes de banana são ortodoxas, pois permaneceram viáveis em baixas temperaturas e com baixo teor de água.

Lopes et al., 2012 realizou criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. Os eixos embrionários foram submetidos à dessecação por 0, 30, 60 e 90 min e à criopreservação em nitrogênio líquido (-196 °C) durante 0, 5, 30 e 60 dias. Como resultado encontrou eixos embrionários de algodoeiro com umidade em

torno de 9,7%, podem ser criopreservados e regenerar mais de 80% de plântulas in vitro.

Com relação à germinação das sementes dessecadas (T2: Sementes dessecadas por 5 horas; T3: Sementes dessecadas por 24 horas e submetidas à criopreservação (T4: Sem dessecação + criopreservação sem NL dentro do criotubo; T5: Sem dessecação + criopreservação com NL dentro do criotubo), foi observado que os genótipos responderam diferentemente do observado nas sementes não dessecadas.

Com exceção do autotetraploide TDM-10 e do tetraploide BRS Princesa 1, o contato indireto da semente com o nitrogênio líquido (criotubos sem NL dentro) resultou em uma percentagem de germinação mais elevada que o controle, tanto para sementes dessecadas por 5 horas quanto as dessecadas por 24 horas. Entre os genótipos, destaca-se o diploide Madu que no tratamento 6 (5 horas de dessecação e sem NL dentro do criotubo) apresentou percentagem de germinação quatro vezes maior que o controle (Tabela 4, Figura 4), diferindo estatisticamente em relação aos resultados dos demais tratamentos.

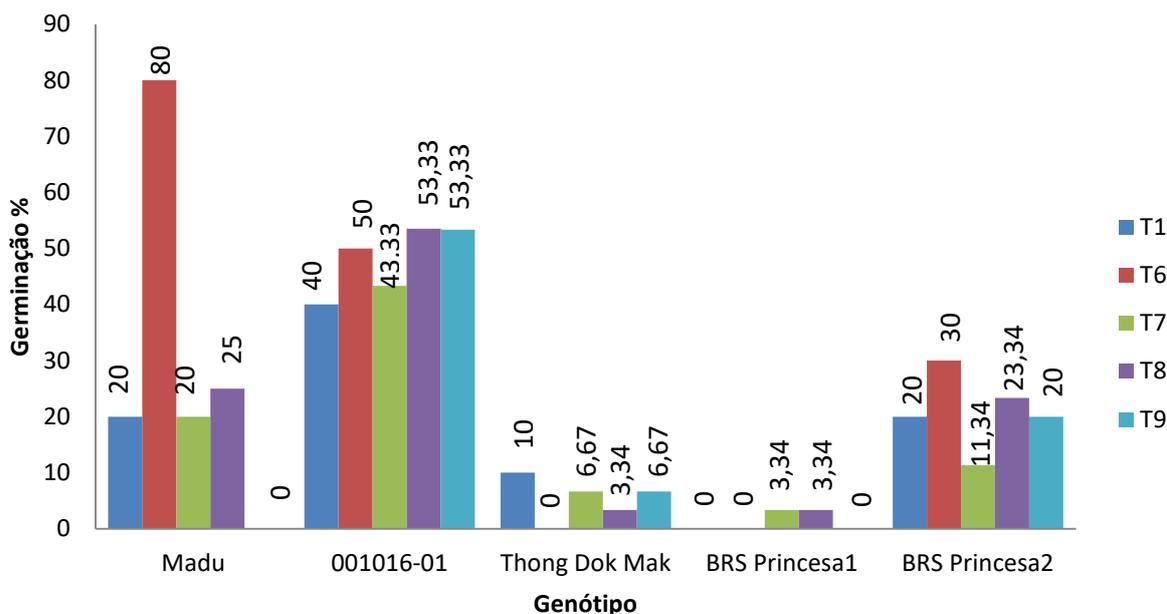


Figura 4: Germinação *in vitro* de embriões excisados de sementes de bananeira submetidas à criopreservação em nitrogênio líquido (NL). T1: Testemunha; T6: Dessecação por 5 horas + criopreservação sem NL dentro do criotubo; T7: Dessecação por 5 horas + criopreservação com NL dentro do criotubo; T8: Dessecação por 24 horas + criopreservação sem NL dentro do criotubo; T9: Dessecação por 24 horas + criopreservação com NL dentro do criotubo

Os estudos de criopreservação de sementes de bananeira geralmente não são realizados com as sementes inteiras, como foi feito neste estudo, mas com embriões excisados (ABDELNOUR-ESQUIVEL et al., 1992; BHAT et al., 1994; VINEESH et al., 2015). Os embriões excisados são pré-cultivados em meio com alta concentração de sacarose e submetidos à dessecação em câmara de fluxo laminar ou sílica gel antes da criopreservação (VINEESH et al., 2015).

O uso de sementes inteiras neste estudo foi devido a necessidade de conservar um grande número de sementes resultantes do programa de melhoramento. Este seria um método mais rápido, pois não seria necessário excisar o embrião de todas as sementes obtidas para poder criopreservar. Além disso, a criopreservação foi realizada em sementes sem a realização prévia de processo de desinfestação, o que também representa uma redução no tempo para realização do armazenamento em nitrogênio líquido.

Experimento II: Germinação de semente de banana em casa de vegetação

Os teores de água nas sementes de banana variaram de 7,86 a 11,13% (Tabela 5), sendo que o genótipo Thong Dok Mak-2 foi o que apresentou maior teor de água. Para a germinação em casa de vegetação foi avaliado apenas o efeito da criopreservação das sementes em contato direto e indireto com o nitrogênio líquido.

Tabela 5. Valores médios de percentagem de teor de água em sementes de genótipos de bananeira.

Genótipo	Teor de água (%)
Birmanie	10,36
Madu	8,20
001016-01	10,90
058054-03	9,80
086079-09	8,16
091079-03	8,26
Thong Dok Mak-2	11,13
BRS Princesa 3	7,86

De maneira geral, a percentagem de germinação das sementes em casa de vegetação foi menor do que as obtidas com o cultivo in vitro de embrião (Tabela 6), o que pode estar relacionado com a algum grau de dormência física que foi suplantado com a excisão do embrião, que permitiu a absorção de água e trocas gasosas, facilitando o processo de germinação (BURGOS-HERNÁNDEZ, 2014).

A germinação das sementes ocorreu a partir de 21 dias, sendo que alguns genótipos germinaram mais tardiamente (em torno de 49 dias). As plantas foram morfológicamente normais para todos os genótipos (Figura 5A-D).

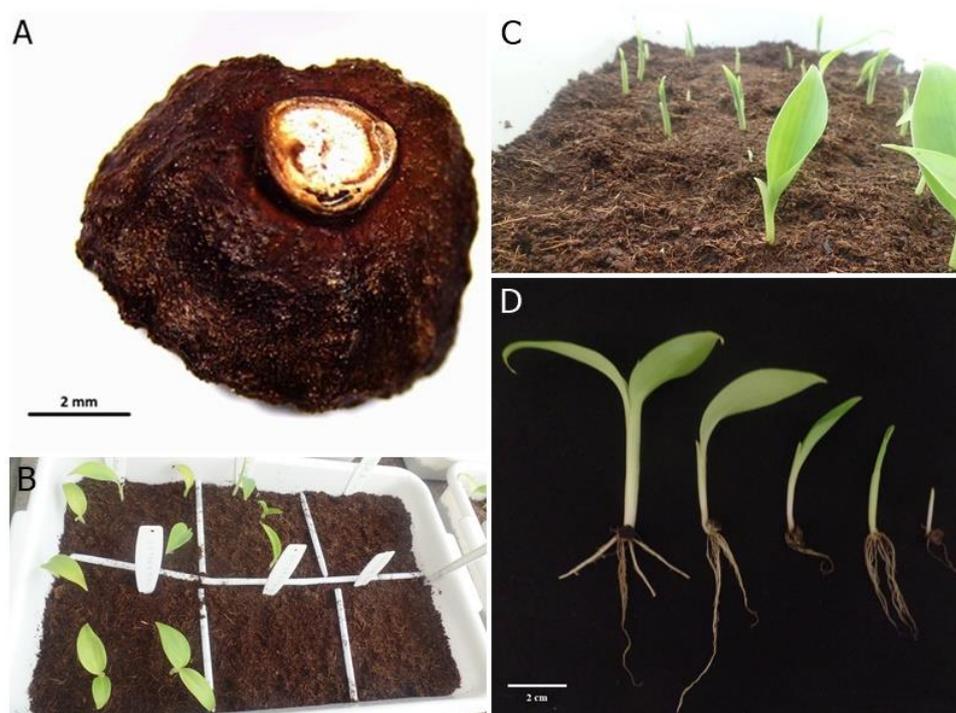


Figura 5: Germinação em casa de vegetação de sementes após à criopreservação de genótipos de *Musa ssp.*. A) Semente de banana após criopreservação; B) emergência das plântulas após 30 dias da sementeira; C) plântulas de bananeira com 90 dias após a sementeira; D) estádios de desenvolvimento de planta após à criopreservação.

Quando analisada a taxa de germinação das sementes submetidas à criopreservação, observou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos (Anexo 2). Entretanto, para seis dos genótipos testados o congelamento em nitrogênio líquido contribuiu para estimular a germinação, sendo observada uma melhora em relação ao controle (Tabela 6).

As maiores percentagens de germinação das sementes de bananeira em casa de vegetação após a criopreservação foi obtida no T3 (criopreservação sem NL dentro do criotubo) para os genótipos Madu (23,33%), 058054-03 (23,33 %), 091079-03 (11,66%) e BRS Princesa 3 (5,00 %). No entanto, para o diploide Birmanie a maior porcentagem de germinação (18,33%) foi obtida quando as sementes foram submetidas ao tratamento T2 (criopreservação com NL dentro do criotubo) (Tabela 6, Figura 6).

Tabela 6. Valores médios de percentagem de germinação em casa de vegetação de sementes de genótipos de bananeira submetidos à criopreservação em nitrogênio líquido (NL).

Tratamentos*	Genótipo							
	Birmanie	Madu	001016-01	058054-03	086079-09	091079-03	Thong Dok Mak-2	BRS Princesa 3
T1	0,00 b	21,67 a	8,33 a	6,67 b	18,33 a	3,33 b	15,00 a	3,33 a
T2	18,33 a	13,33 a	11,67 a	11,67 ab	20,00 a	1,67 b	5,00 b	3,33 a
T3	1,67 b	23,33 a	6,66 a	23,33 a	16,66 a	11,66 a	5,00 b	5,00 a

*T1: Testemunha; T2: Sementes dentro de criotubo com NL; T3: Sementes dentro de criotubos sem NL; Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As sementes podem apresentar restrições para a germinação, como o tegumento, que pode limitar fisicamente à passagem de gases e líquidos (VINEESH et al., 2015). Assim, sugere-se que o contato direto da semente com o nitrogênio líquido possa ter tido um efeito na ruptura do tegumento da semente permitindo a absorção de água, facilitando assim a germinação.

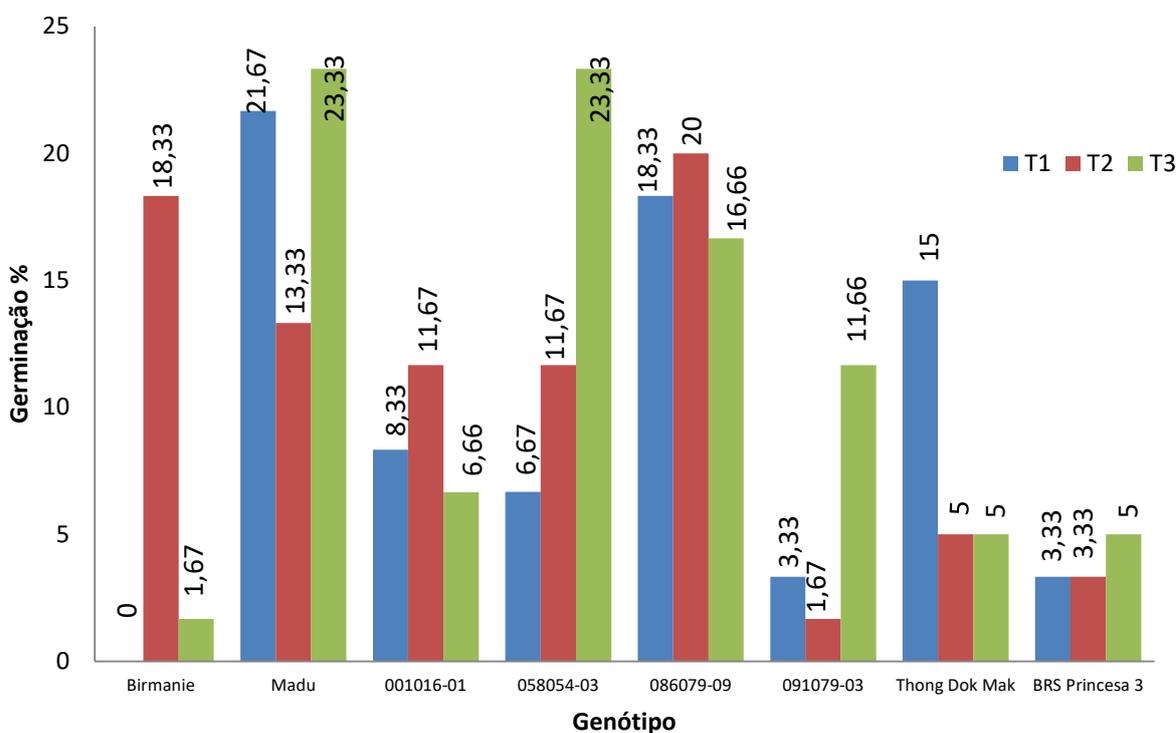


Figura 6: Percentagem de germinação em casa de vegetação de sementes de genótipos de bananeira submetidos à criopreservação em nitrogênio líquido (NL) T1: Testemunha; T2: criopreservação com NL dentro do criotubo e T3: criopreservação sem NL dentro do criotubo.

Dessa forma, a técnica da criopreservação mostra-se como uma ferramenta de conservação de germoplasma promissora, uma vez que, para a maioria dos acessos testados a germinação das sementes foi mais elevada que a do controle.

CONCLUSÕES

A germinação de sementes é variável entre os genótipos de bananeira. O resgate de embrião proporciona maior percentagem de germinação e em menos tempo que a germinação em casa de vegetação. Sendo que a dessecação das sementes em sílica por cinco horas antes do resgate de embrião possibilita o aumento da taxa de germinação, podendo ser uma prática a ser empregada antes do resgate de embrião e cultivo *in vitro*. O contato direto com nitrogênio líquido durante a criopreservação pode elevar a taxa de germinação de sementes de banana em casa de vegetação. Entretanto, no cultivo *in vitro* o contato indireto é que proporciona maior taxa de germinação.

REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; MORA, A.; VILLALOBOS, V. Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *Musa balbisiana* (BB). **Cryo-letters**, v.13, p.159-164, 1992.
- AHMED, K. Z.; REMI, S.; SÁGI, L.; SWENNEN, R. Germination of *Musa balbisiana* seeds and embryos. In: International Meeting ACORBAT. **Annals**, Joinville (SC), v.17, 2006.
- ALMEIDA, F.A.C.; HARA, T.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. **Armazenamento de sementes nas propriedades rurais**. Campina Grande: UFPB. 1997. 291p.
- ALMEIDA, F.A.C.; MORAIS A.M.; CARVALHO J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. Cryoconservation of nordestina and pernambucana varieties of castor bean seeds. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n.2, p.295-302, 2002.
- AMARAL, A. L.; OLIVEIRA, P. R. D.; CZERMAINSKI, A. B. C.; CAMARGO, U. A. Estádios de desenvolvimento de embriões na obtenção de plantas em cruzamentos entre genitores apirenos de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.23, n.3, p.647-651, 2001.
- AMARAL, C.M.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA, S.O.; LEDO, C.A.S.; AMORIM, E.P. Agronomic characterization of autotetraploid banana plants derived from 'Pisang Lilin' (AA) obtained through chromosome doubling. **Euphytica**, v.202, p.435-443, 2015.
- AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O. Banana Breeding at Embrapa Cassava and Fruits. **Acta Horticulturae**, v. 986, p.171-176, 2013.
- AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, V. B. O.; SILVA, S. O. Melhoramento genético. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. (1ª Ed.). **O agronegócio da banana**, Brasília, DF: Embrapa, p. 171-200, 2016.
- ANGELOVICI, R.; GALILI, G., FERNIE, A.R.; FAIT, A. Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science*, v.15, p. 211-218, 2010.
- ASIF, M.J.; MAK, C.; OTHMAN, R.Y. *In vitro* zygotic embryo culture of wild *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis* and factors affecting germination and seedling growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p.267-270, 2001.
- ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryo-Letters**, v.13, p.67-74, 1992.
- BAKRY, F. Zygotic embryo rescue in bananas. **Fruits**, v.63, n.2, p.111-115, 2008.
- BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, vol. 32., p 3-28. 1995.

BARBEDO, C.J.; MARCOS FILHO, J. Desiccation Tolerance in Seeds. **Acta Botanica Brasilica**, v.12, p.145-164, 1998.

BASKIN J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v.14, p.1-16, 2004.

BORGES, V.P.; MARQUES, T.S.; REIS, A.S.; OLIVEIRA, N.H.C.; JESUS, J.A.; SILVEIRA, D.G.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SILVA, S.O.; LEDO, C.A.S. Desenvolvimento in vitro de bananeira 'Ouro' após poliploidização com antimitóticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, p.1789-1793, 2016.

BRAGANTINI, C. **Alguns aspectos do armazenamento de sementes e grãos de feijão**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p.28, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**, Brasília: MAPA/ACS, 399 p., 2009.

BURGOS-HERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ H.D.; CASTILLO-CAMPOS, G. (). Genetic diversity and genetic structure population of *Musa ornata* (Musaceae) in México. **Plant Systematic and Evolution**, v.299, p.1899-1910, 2013.

COSTA, F.H.S; PASQUAL, M.; SILVA, S.O.; SILVA NETO, H.P.; AMORIM, E.P.; SANTOS-SEREJO, J.A. Poliploidização em ápices caulinares de bananeira e seus efeitos morfofisiológicos in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.805-813, 2011.

CHIN, H. F. Germination and storage of banana seeds. In: FRISON, E.A., HORRY, J.P., DE WAELE, D. (Eds.), Workshop on New Frontiers in Resistance Breeding for Nematode, *Fusarium* and Sigatoka, 1995. Kuala Lumpur. **Proceedings**. Montpellier: International Network for the Improvement of Banana and Plantain, p.218-227, 1996.

IBGE. **Área, produção e rendimento médio - confronto das estimativas maio/junho de 2018 (banana)**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 20 de jul. 2018.

DAYARANI, M.; DHANARAJAN, M. S; UMA, S.; GOMATHI, M. **Conservation of wild bananas (*Musa spp.*) through seeds and improved regeneration through seed treatments**. International Conference on Green Technology and Environmental Conservation (GTEC, 2011), p. 188-190. Disponível em <<http://ieeexplore.ieee.org/document/6167668/>> Acesso em: 20 de dezembro de 2018.

DE LANGHE, E.; VRYDAGHS, L.; MARET, P.; PERRIER, X.; DENHAM, T. Why Bananas Matter: An introduction to the history of banana domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v.7, p.165-177, 2009.

DELVALLÉE, I.; GUILLAUD, J.; BECKERT, M.; DUMAS, C. Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and *in vitro*. **Plant Science**, 60: 129-136, 1989.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v.41, p.1167–1174, 1990.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resource News**, v.112, p. 9–18, 1997.

FINCH-SAVAGE, W.E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v.17, p.501-523, 2006.

GRAVEN, P.; DE KOSTER, C. G.; BOON, J. J.; BOUMAN, F. Structure and macromolecular composition of the seed coat of the Musaceae. **Annals of Botany**, p. 105-122, 1996.

HAKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in Musa (Musaceae). **Taxon**, v. 62, n. 4, p. 809-813, 2013.

HILL, J. P.; EDWARDS, W.; FRANKS, P. J. How long does it take for different seeds to dry. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 575-583, 2010.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, v. 1, p. 371-393, 1998.

KARTHA, K. K. **Cryopreservation of Plant Cells and Organs**. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p.276. 1985.

KEBREAB, E.; MURDOCH, A.J. A model of the effects of a wide range of constant and alternating temperatures on seed germination of four Orobanche species. **Annals of Botany**, v.84, p.549–557, 1999.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S, Water Relations of Plants and Soils. **Academic Press**, New York 1995.

LEDO, A.S; LAMEIRA, O.A; BENBADIS, A.K.; MENEZES, I.C.; LEDO, C.A.S; OLIVEIRA, M.S.P. Cultura *in vitro* de embriões zigóticos de açaizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 468-472, 2001.

LOPES, K.P; ALMEIDA, F.A.C., CARVALHO, J.M.F.C.; BRUNO, R.L.A. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v17, n.3 p.291-298, 2013.

MASETTO, T.E.; FARIA, J.M.R.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A. Desiccation tolerance and DNA integrity in *Eugenia pleurantha* O. Berg. (Myrtaceae) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p.175-180, 2008.

MATA, M. E. R. M. C. Tecnologia de crioconservação de sementes de urucum. **Tecnologia e Ciências Agropecuária**, v. 2, p. 1-9, 2008.

MATHEW, N. S.; NEGI, P. S. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of wild banana (*Musa acuminata* Colla): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 196 p. 124–140, 2017.

MAZUR, P. Freezing injury in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v. 20, p.419-425, 1969.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.5, p.473-497, 1962.

NWAUZOMA, A. B.; MOSES, K. Factors affecting seedling emergence and dry matter characteristics in *Musa balbisiana* Colla. **ISRN Botany**, v.2013, ID 582581, 2013.

ORTIZ, R.; VUYLSTEKE, D. Factors influencing seed set in triploid *Musa* spp. L. and production of euploid hybrids. **Annals of Botany**, v.75, p.151-155, 1995.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, v.10, p.301-306, 2000.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P.; WESLEY-SMITH, J.; WILLIGEN, C. V. Experimental aspects of drying and recovery. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Ed.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. New York: CAB International, p. 93-110, 2002.

PANCHOLI, N.; WETTEN, A.; CALIGARI, P. D. S. Germination of *Musa velutina* seeds: comparison of in vivo and *in vitro* systems. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.31, p.127-130, 1995.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: RUANE, J; SONNINO, A. (Ed.) **The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources**. Rome, FAO, 2005.

PANIS, B.; WITHERS, L.A.; DE LANGHE, E. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. **Cryo-Letters**, v.11, p.337-350, 1990.

PANIS, B. Cryopreservation of *Musa* germplasm. 2nd ed. Montpellier: **Bioversity International**,(INIBAP Technical Guideline, 9). 2009. 48 p.

PRITCHARD, H. W.; NADARAJAN. J. **Cryopreservation of Orthodox (Desiccation Tolerant) Seeds**. Department, Royal Botanic Gardens Kew, Wakehurst Place, Ardingly, West Sussex RH17 6TN. 2008

PERRIER, X; De LANGHE, E.; DONOHUE, M., Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.28, p.11311-11318, 2011.

PIO, L.A.S.; PASQUAL, M.; SILVA, S.O.; ROCHA, H.S.; MAGALHÃES, H.M.; SANTOS-SEREJO, J.A. Inducing and identifying artificially-induced polyploidy in bananas. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p.3748-3758, 2014.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>, 2014.

REED, B.M. Cryopreservation – practical considerations. In: REED, B.M. (ed) **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Springer. p. 3-13. 2008.

REIS, A. M. M.; CUNHA, R. Efeito do congelamento sobre a viabilidade de sementes de *Anadenanthera peregrine* (L.) Speg com diferentes conteúdos de umidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p. 1071-1079, 1997.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499–514, 1973.

SANTOS, I. R.; Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.4, p.60-65, 2001.

SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; JESUS, O. N.; SILVA, S. O. Germoplasma de Musa: Conservação, caracterização e uso. In: FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A. (1ª Ed.). **O agronegócio da banana**. Brasília, DF: Embrapa, p.111-136, 2016.

SILVA, S. O.; AMORIM, E. P.; SANTOS-SEREJO, J. A.; FERREIRA, C. F.; ROGRIGUEZ, M. A. D. Melhoramento genético da bananeira: estratégias e tecnologias disponíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, p.919-931, 2013.

SILVA, L. M. M.; MATA, M. E. R. M. C.; DUARTE, M. E. M. Teor de água limite para crioconservação de sementes de romã (*Punica granatum* L.). **Engenharia Agrícola**, v.35, n.2, p.313-321, 2015.

SHEPHERD, K. **Taxonomia e caracterização de cultivares de banana**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 1984.

SIMMONDS, N. W. **The Evolution of the Bananas**. London: Longmans. 1962. 170p.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **The journal of the Linnean Society of London**, London, v. 55, p. 302-312, 1955.

SOUZA, A. S.; VIDAL, A. M.; MENDES, M. I. S.; SILVA NETO, H. P. **Resgate e cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de mamão: um guia ilustrado**. Cruz das Almas: EMBRAPA - CNMF, 2011. (Circular Técnica, 105).

STOTZKY, G.; COX, E. A. Seed germination in *Musa* II. Alternating temperature requirement for the germination of *Musa balbisiana*. **American Journal of Botany**, v.49, p.763-770, 1962.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 32, **Cryopreservation of Plant Germplasm** I. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, p. 87-10, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858p. TENKOUANO, A.; PILLAY, M.; ORTIZ, R. Breeding Techniques. In: PILLAY, M.; TENKOUANO, A. (eds.). **Banana Breeding Progress and Challenges**, CRC Press, London, p.181–202, 2011.

UMA, S.; LAKSHMI, S.; SARASWATHI, M. S.; AKBAR, A.; MUSTAFFA, M. M. Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa* spp. L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.105, p.105-111, 2011.

VEIGA-BARBOSA, L.; MIRA, S.; GONZALEZ-BENITO, M.E.; SOUZA, M.M.; MELETTI, L.M.M. Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. **Seed Science and Technology**, v.41, p.89-97, 2013.

VINEESH, P.S.; SKARIA, R.; MUKUNTHAKUMAR, S.; PADMESH, P.; DECRUSE, S.W. Seed germination and cryostorage of *Musa acuminata* subsp. *Burmannica* from Western Ghats. **South African Journal of Botany**, v.100, p.158–163, 2015.

WEN, B.; WANG, R. Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of *Sabal* embryos. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**. v.102, p.237-243, 2010.

WETZEL, M. M. V. S.; REIS, R. B.; RAMIS, K. M. **Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas**. Circular Técnica 26, Embrapa, 2003.

ANEXOS

Anexo 1. Análise de variância para a germinação *in vitro* de sementes de genótipos de bananeira submetidos à criopreservação em nitrogênio líquido.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	0,72	0,36	5,82	0,0042
Genótipo	4	6,37	1,59	25,58	0,0000
Dessecação	2	0,56	0,28	4,47	0,0141
Tratamento*Genótipo	8	1,02	0,13	2,06	0,0486
Tratamento*Dessecação	4	0,05	0,01	0,18	0,9471
Genótipo*Dessecação	8	0,68	0,09	1,37	0,2205
Tratamento*Genótipo*Dessecação	16	1,23	0,08	1,24	0,2568
Erro	90	5,60	0,06		
Total	134	16,23			
CV (%)					64,92
Média geral					21,48

Anexo 2. Análise de variância para a germinação em casa de vegetação de sementes de genótipos de bananeira submetidos à criopreservação em nitrogênio líquido.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	2	0,012	0,006	0,873	0,4307
Genótipo	1	0,000	0,000	0,004	0,9489
Local	1	0,000	0,000	0,012	0,9134
Tratamento*genótipo	2	0,033	0,016	2285,000	0,1235
Tratamento*local	2	0,000	0,000	0,015	0,9851
Genótipo*local	1	0,050	0,050	7016,000	0,0141
Tratamento*genótipo*	2	0,003	0,002	0,239	0,7892
Erro	24	0,171	0,007		
Total	35	0,269			
CV (%)					56,280
Média Geral					2,940